

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-501703

(43) 公表日 平成8年(1996)2月27日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 7/00		8931-4B	
A 6 1 K 31/70	ADU	9454-4C	
	ADY		
		9281-4B	C 1 2 N 15/00
		7729-4B	5/00
			A
			B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-504368
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)7月8日
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)3月13日
 (86) 国際出願番号 PCT/FR94/00851
 (87) 国際公開番号 WO95/02697
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)1月26日
 (31) 優先権主張番号 93/08596
 (32) 優先日 1993年7月13日
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 94/04590
 (32) 優先日 1994年4月18日
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

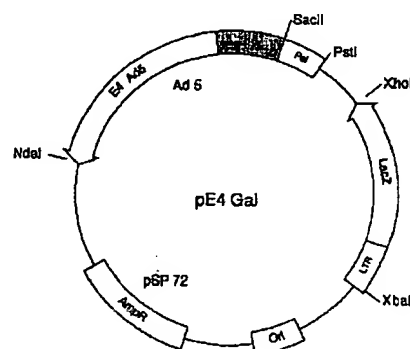
(71) 出願人 ローネーブーラン・ロレ・ソシエテ・アノ
 ニム
 フランス国エフー92160アントニイ・アベ
 ニューレイモンドーアロン20
 (72) 発明者 ペリコーデ, ミシエル
 フランス国エフー28320エクロスヌ・リュ
 ドウシャルトル31
 (72) 発明者 ビニユ, エマニユエル
 フランス国エフー94200イブリーシュール
 ーセーヌ・リュジャンールーガル60
 (74) 代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 欠陥組換えアデノウイルスベクター及び遺伝子治療での使用

(57) 【要約】

新規なアデノウイルス-誘導ウイルスベクター、その製造及び遺伝子治療でのその使用が開示されている。



X
H2d1808

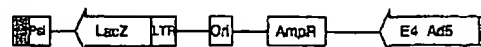


Figure 4

DEFECTIVE ADENOVIRUS VECTORS AND USE THEREOF IN GENE THERAPY

Publication number: JP8501703 (T)

Publication date: 1996-02-27

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: C12N15/09; A61K31/70; A61K48/00; A61P31/12; A61P35/00; C07K14/075; C12N5/10; C12N7/00; C12N7/04; C12N15/861; C12N15/09; A61K31/70; A61K48/00; A61P31/00; A61P35/00; C07K14/005; C12N5/10; C12N7/00; C12N7/04; C12N15/861; (IPC 1-7): C12N7/00; A61K31/70; A61K48/00; C12N5/10; C12N7/04; C12N15/09

- **European:** C07K14/075; C12N7/04A; C12N15/861

Application number: JP19940504368T 19940708

Priority number(s): WO1994FR00851 19940708; FR19930008596 19930713;
FR19940004590 19940418

Also published as:

 WO9502697 (A1)

SK31295 (A3)

SK31295 (A3)

SK282843 (B6)

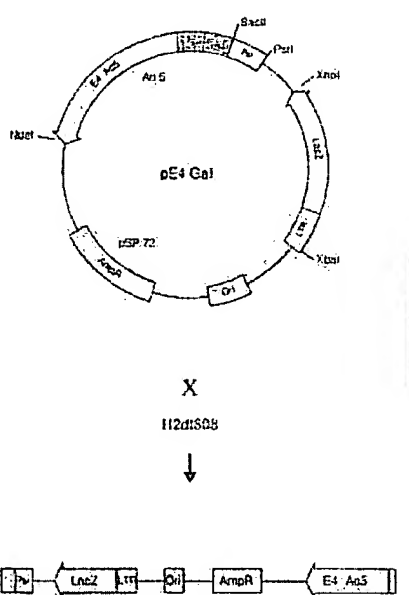
SK282843 (B6)

[more >>](#)

Abstract not available for JP 8501703 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9502697 (A1)**

Novel adenovirus-derived viral vectors, the preparation thereof, and the use thereof in gene therapy, are disclosed.

Data supplied from the *esp@cenet* database — Worldwide



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, 15/34, 5/10, 7/04, C07K 14/075	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/02697 (43) Date de publication internationale: 26 janvier 1995 (26.01.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00851 (22) Date de dépôt international: 8 juillet 1994 (08.07.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/08596 13 juillet 1993 (13.07.93) FR 94/04590 18 avril 1994 (18.04.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). VIGNE, Emmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-le-Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). YEH, Patrice [FR/FR]; 11 bis, rue Lacepède, F-75005 Paris (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).		(81) Etats désignés: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>

(54) Title: DEFECTIVE ADENOVIRUS VECTORS AND USE THEREOF IN GENE THERAPY

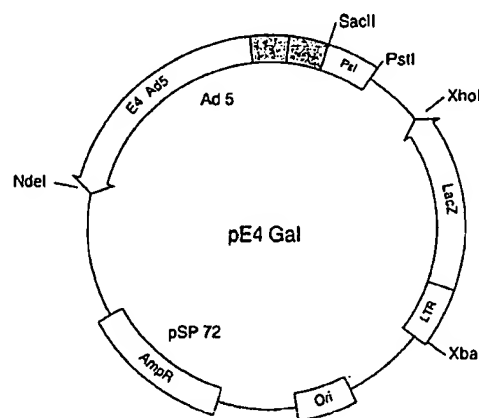
(54) Titre: VECTEURS ADENOVIRAUX DEFECTIFS ET UTILISATION EN THERAPIE GENIQUE

(57) Abstract

Novel adenovirus-derived viral vectors, the preparation thereof, and the use thereof in gene therapy, are disclosed.

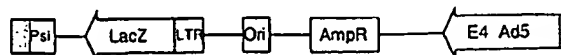
(57) Abrégé

La présente invention concerne de nouveaux vecteurs viraux dérivés des adénovirus, leur préparation et leur utilisation en thérapie génique.



X

H2dl808



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-501703

(43) 公表日 平成8年(1996)2月27日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 7/00		8931-4B	
A 6 1 K 31/70	ADU	9454-4C	
	ADY		
		9281-4B	C 1 2 N 15/00
		7729-4B	5/00
			A
			B
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 46 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平7-504368
(86) (22) 出願日 平成6年(1994)7月8日
(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)3月13日
(86) 国際出願番号 PCT/FR94/00851
(87) 国際公開番号 WO95/02697
(87) 国際公開日 平成7年(1995)1月26日
(31) 優先権主張番号 93/08596
(32) 優先日 1993年7月13日
(33) 優先権主張国 フランス (F R)
(31) 優先権主張番号 94/04590
(32) 優先日 1994年4月18日
(33) 優先権主張国 フランス (F R)

(71) 出願人 ローネーブーラン・ロレ・ソシエテ・アノニム
フランス国エフ-92160アントニイ・アベニューレイモンドーアロン20
(72) 発明者 ベリコーデ, ミシエル
フランス国エフ-28320エクロスヌ・リュドウシャルトル31
(72) 発明者 ビニユ, エマニユエル
フランス国エフ-94200イブリーシュールーセーヌ・リュジャンヌルーガル60
(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 欠陥組換えアデノウイルスベクター及び遺伝子治療での使用

(57) 【要約】

新規なアデノウイルス-誘導ウイルスベクター、その製造及び遺伝子治療でのその使用が開示されている。

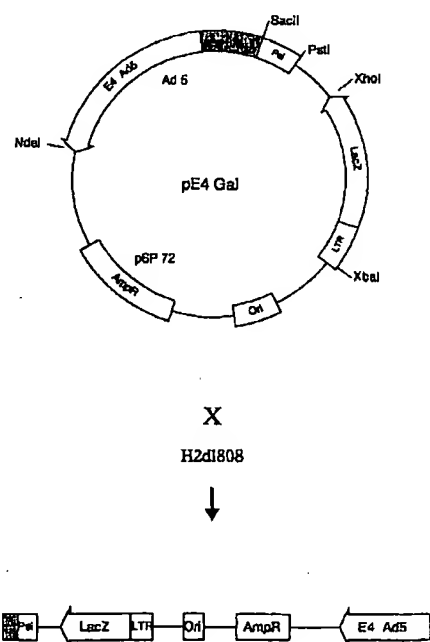


Figure 4

【特許請求の範囲】

1. — I T R 配列、
 — 被包を許容する配列、
 — D N A 配列

を含み、そしてE 1 遺伝子ならびにE 2、E 4 及びL 1 ～L 5 遺伝子の少なくとも1 種が非機能的である欠陥組換えアデノウイルス。

2. ヒト、動物又は混合の起源のものであることを特徴とする請求の範囲第1 項記載のアデノウイルス。

3. ヒト起源のアデノウイルスが、好ましくは2 又は5 型のアデノウイルス（A d 2 又はA d 5）からの、グループC に分類されるものから選択されることを特徴とする請求の範囲第2 項記載のアデノウイルス。

4. 動物起源のアデノウイルスが、イヌ、ウシ、ネズミ、ヒツジ、ブタ、トリ又はサル起源のアデノウイルスから選択されることを特徴とする請求の範囲第2 項記載のアデノウイルス。

5. 少なくともE 1 及びE 4 遺伝子が非機能的であることを特徴とする請求の範囲先行項のいずれかに記載のアデノウイルス。

6. 後期遺伝子が欠失していることを特徴とする請求の範囲先行項のいずれかに記載のアデノウイルス。

7. — I T R 配列、
 — 被包を許容する配列、
 — 異型D N A 配列、及び
 — E 2 遺伝子又はその一部を担持する領域

を含むことを特徴とする請求の範囲第1 項記載のアデノウイルス。

8. — I T R 配列、
 — 被包を許容する配列、
 — 異型D N A 配列、及び
 — E 4 遺伝子又はその一部を担持する領域

を含むことを特徴とする請求の範囲第1 項記載のアデノウイルス。

9. E 1、E 3及びE 4 遺伝子とそのゲノムから欠失していることを特徴とする請求の範囲第1項記載のアデノウイルス。

10. E 1、E 3、L 5及びE 4 遺伝子とそのゲノムから欠失していることを特徴とする請求の範囲第1項記載のアデノウイルス。

11. さらに、異型プロモーターの制御下で機能的なE 3 遺伝子を含むことを特徴とする請求の範囲先行項のいずれかに記載のアデノウイルス。

12. 異型DNA配列が1種以上の治療性遺伝子及び／又は抗原性ペプチドをコード化する1種以上の遺伝子を含むことを特徴とする請求の範囲先行項のいずれかに記載のアデノウイルス。

13. 治療性遺伝子が、酵素、血液誘導剤、ホルモン、リンホカイン（インターロイキン、インターフェロン、TNFなど）、成長因子、神経伝達物質又はそれらの前駆体又は合成酵素、栄養因子（BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、NT3、NT5など）、アポリポ蛋白質（ApoA I、ApoA IV、ApoEなど）、ジストロフィン（dystrophin）又はミニジストロフィン（minidystrophin）をコード化する遺伝子、腫瘍サプレッサー遺伝子または凝固に関与する因子（VII、VIII、IX因子など）をコード化する遺伝子から選択されることを特徴とする請求の範囲第12項記載のアデノウイルス。

14. 治療性遺伝子が、標的細胞中における発現が遺伝子の発現又は細胞mRNAの転写の制御を可能にするアンチセンス遺伝子又は配列であることを特徴とする請求の範囲第12項記載のアデノウイルス。

15. 遺伝子が、ヒトに微生物又はウイルスに対する免疫応答を生じさせることができる抗原性ペプチドをコード化することを特徴とする請求の範囲第12項記載のアデノウイルス。

16. 遺伝子が、エプスタインバールウイルス、HIVウイルス、B型肝炎ウイルス、仮性狂犬病ウイルスに対して特異的なあるいは腫瘍に対して特異的な抗原性ペプチドをコード化することを特徴とする請求の範囲第15項記載のアデノウイルス。

17. 異型DNA配列が、感染細胞中で治療性遺伝子及び／又は抗原性ペプチドをコード化する遺伝子の発現を許容する配列をも含むことを特徴とする請求の範囲先行項のいずれかに記載のアデノウイルス。

18. 異型DNA配列が、治療性遺伝子上流に、標的細胞の分泌経路で合成される治療性産物に向けられるシグナル配列を含むことを特徴とする請求の範囲先行項のいずれかに記載のアデノウイルス。

19. そのゲノム中に組み込まれた状態で、請求の範囲第1～18項のいずれかに記載の欠陥組換えアデノウイルスの補足に必要な機能を含むアデノウイルスに感染できる細胞系。

20. そのゲノム中に、アデノウイルスからの少なくともE1及びE2遺伝子を含むことを特徴とする請求の範囲第19項記載のアデノウイルス。

21. さらに、アデノウイルスからのE4遺伝子を含むことを特徴とする請求の範囲第20項記載の細胞系。

22. そのゲノム中に、アデノウイルスからの少なくともE1及びE4遺伝子を含むことを特徴とする請求の範囲第19項記載の細胞系。

23. さらに、グルコシルチコイドレセプターに関する遺伝子を含むことを特徴とする請求の範囲第19～22項のいずれかに記載の細胞系。

24. E2及びE4遺伝子が誘導プロモーターの制御下に位置することを特徴とする請求の範囲第19～23項のいずれかに記載の細胞系。

25. 誘導プロモーターがMMTVのLTRプロモーターであることを特徴とする請求の範囲第24項記載の細胞系。

26. E2遺伝子が72K蛋白質をコード化することを特徴とする請求の範囲第19～25項のいずれかに記載の細胞系。

27. 293系から得られることを特徴とする請求の範囲第19～26項のいずれかに記載の細胞系。

28. 請求の範囲第1～18項のいずれかに記載の少なくとも1種の欠陥組換えアデノウイルスを含む製薬組成物。

29. 請求の範囲第5～10項のいずれかに記載の組換えアデノウイルスを含む

請求の範囲第 28 項記載の製薬組成物。

30. 注射製剤用に薬学上許容できる賦形剤を含むことを特徴とする請求の範囲第 28 又は 29 項記載の製薬組成物。

【発明の詳細な説明】

欠陥組換えアデノウイルスベクター及び遺伝子治療での使用

本発明は新規なウィルスベクター、それらの製造及び遺伝子治療へのそれらの使用に関する。本発明はまた前記ウィルスベクターを含む製薬組成物にも関する。より詳細には、本発明は遺伝子治療用のベクターとしての組換えアデノウイルスにも関する。

遺伝子治療は、遺伝情報を細胞又は患部器官に導入することにより欠損または異常（突然変位、異常発現など）を修正することにある。この遺伝情報は生体外又は器官から摘出された細胞中のいずれかに導入され得、次いで修飾された細胞は体内にあるいは生体内的に適宜な組織中に直接再導入される。この第二の場合種々の技術が存在し、それらの中で種々のトランスフェクション技術は、DNA及びDEAE-デキストランの複合体（Pagano et al., J. Virol. 1 (1967) 891）、DNA及び核蛋白質の複合体（Kaneda et al., Science 243 (1989) 375）、DNA及び脂質の複合体（Felgner et al., DNAS 84 (1987) 7413）、リポソームの使用（Fraley et al., J. Biol. Chem. 255 (1980) 10431）などを必要とする。より最近、遺伝子の伝達用ベクターとしてのウィルスの使用がそれらの物理的なトランスフェクション技術の有望な代替として現われてきている。この点で、種々のウィルス、特にレトロウィルス（RSV、HMS、MMSなど）、HSVウィルス、アデノ随伴ウィルス及びアデノ

ウィルスが一定の細胞集団へのそれらの感染能につき試験されている。

それらウィルスの中で、アデノウイルスが遺伝子治療への使用に対していくつかの有利な特性をもつ。特に、それらはかなり広範な宿主スペクトルを有し、静止細胞に感染することが可能であり、感染細胞のゲノム中に組み込まれることなく、現在までヒトの主たる病状に無関係である。

アデノウイルスは、約36kbのサイズの線状2本鎖DNAである。それらのゲノムは、特にそれら末端に逆方向反復塩基配列（ITR）、被包（encap

sulation) 配列、初期遺伝子及び後期遺伝子を含む(図1参照)。主たる初期遺伝子はE1 (E1a及びE1b)、E2、E3及びE4遺伝子である。主たる後期遺伝子はL1～L5遺伝子である。

上述のアデノウイルスの性質を考慮して、後者は生体内の遺伝子伝達に既に使用されてきている。このため、アデノウイルスから誘導される種々のベクターが種々の遺伝子(β -gal、OTC、 α -1AT、サイトカインなど)を組み込んで調製されてきている。それらの構成物の各々では、感染細胞中で複製できなくなるようにアデノウイルスが修飾されていた。従って、先行技術に記載されている構成物は、その位置に異型DNA配列が挿入されるE1 (E1a及び/又はE1b) 及び場合によりE3領域が欠失しているアデノウイルスである(Levero et al., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161)。それにもかかわらず、先行技術に記述されているベクターは遺伝子治療でのそれらの利用を制限する数多くの欠点を有する。特に、すべてのそ

れらベクターは、遺伝子治療の枠組内で生体内の発現が望まれない数多くのウイルス遺伝子を含む。さらに、それらのベクターは一定の適用に必要とされる非常に大きなDNAの挿入を許容しない。

本発明はそれら欠点を解消することを可能にした。本発明は、ウイルス蛋白質の生産、ウイルスの伝染、病原性などのいずれかの危険を限定する一方、生体内で(kbまでの)DNAを効率的に伝達でき、生体内でこのDNAを高濃度で且つ安定な態様で発現することを可能にする遺伝子治療用の組換えアデノウイルスを、実際に、記述する。特に、被包ウイルス粒子の形成を防止することなくアデノウイルス遺伝子の大きさを相当減少させることができることが見いだされた。他のウイルス、例えばレトロウイルスの場合、ウイルス粒子の効率的な被包に必要なゲノムに沿って一定の配列が分配したことが観察されているので、このことは驚くべきことである。これらのため、相当な内部欠失を有するベクターの生産は大幅に限定されていた。本発明は、また、ほとんどのウイルス遺伝子のサプレッションがそのようなウイルス粒子の形成を防止しないことを示す。さらに、こ

のようにして得られる組換えアデノウイルスは、それらのゲノム構造の相当な修飾にもかかわらず、高感染能、生体内での安定性などのそれら有利性を維持する。

本発明のベクターは、非常に大きなサイズの望ましいDNA配列の挿入を許容するので、本発明のベクターは特に有利である。従って、30kbより長い長さの遺伝子を挿入することが可能である。治療が数個の遺伝子の同時一発現又は非常に大きな遺伝子の発現を必要とするいくつかの病状に対して、これは特に有利である。従って、例えば筋ジストロフィーの場合、その大きなサイズ(14kb)のために、この病状の原

因となる自然遺伝子〔ジストロフィン(dystrophin)遺伝子]に対応するcDNAを伝達することが今日まで可能ではなかった。

本発明のベクターは機能的ウイルス領域をほとんど有さず、そしてこのため、例えば免疫原性、病原性、伝染、適用、組換えなどのような遺伝子治療におけるベクターとしてのウイルスの使用に特有な危険が、相当減少され又は抑制すらなされるため、本発明のベクターはまた非常に有利である。

従って、本発明は、生体内での望ましいDNA配列の伝達及び発現に特に適合するウイルスベクターを提供する。

従って、本発明の第一の主題は、

- ITR配列、
- 被包(encapsulation)を許容する配列、
- 異型DNA配列

を含み、そして

- E1遺伝子が非機能的であり、そして
- E2、E4及びL1～L5遺伝子の少なくとも1種が非機能

的である

欠陥組換えアデノウイルスに関する。

本発明の目的上、述語「欠陥アデノウイルス」は標的細胞中で自律的に複製できないアデノウイルスを意味する。従って、一般に本発明に従う欠陥アデノウイ

ルスのゲノムは、感染細胞中で前記ウイルスの複製のために必要とされる配列を最悪でも含まない。それら領域は、（完全に又は部分的に）除去され得るか、あるいは非機能的にされるか、あるいは他の配列、特に異型DNA配列により置換されるかのいずれかである。

逆方向反復塩基配列（ITR）はアデノウイルスの複製開始点を構成する。それらはウイルスゲノムの3'及び5'末端に位置し（図1参照）、そこからそれらは当業者に公知の常用の分子生物学的技術に従い容易に単離され得る。（特にAd2及びAd5血清型）ヒトのアデノウイルス及び（特にCAV1及びCAV2）イヌのアデノウイルスのITR配列のヌクレオチド配列が文献に記載されている。例えばAd5アデノウイルスに関して、左ITR配列はゲノムのヌクレオチド1～103を含む領域に対応する。

被包配列（Psi配列とも表示される）はウイルスDNAの被包のために必要とされる。従って、本発明に従う欠陥組換えDNAの調製を許容するために、この領域は存在しなければならない。被包配列は、アデノウイルスのゲノム中の、左（5'）ITRとE1の間に位置している（図1参照）。それは常用の分子生物学的技術により単離されあるいは人工的に合成できる。（特にAd2及びAd5血清型）ヒトのアデノウイルスの被包配列のヌクレオチド配列及び（特にCAV1及びCAV2）イヌのアデノウイルスは文献に記載されている。例えばAd5アデノウイルスに関して、被包配列はゲノムのヌクレオチド194～358を含む領域に対応する。

その構造及び性質が幾分か異なる種々のアデノウイルス血清型がある。それにもかかわらず、それらウイルスは同様の遺伝構成を示し、そして本明細書に記載されている情報はいずれかの種類のアデノウイルスの分野の当業者によって容易に再生され得る。

本発明のアデノウイルスはヒト、動物又は混合（ヒト及び動物）の起源のものであってよい。

ヒト起源のアデノウイルスに関してば、グループCに分類されるものの使用が

好ましい。より好ましくは、種々のヒトのアデノウイルスの血清型の中で、2又は5型のアデノウイルス（Ad2又はAd5）が本発明の枠組内で好ましい。

上記で示したように、本発明のアデノウイルスはまた動物起源のもの、あるいは動物起源のアデノウイルスから誘導される配列を含んでいてもよい。出願人は、実際に、動物起源のアデノウイルスが高効率でヒト細胞に感染でき、そしてそれらを試験したヒト細胞中で増殖できないことを示した（仏出願第93 059 54号参照）。出願人は、また、動物起源のアデノウイルスがヒト起源のアデノウイルスにより全くトランス補足されないことを示したが、このことはヒトのアデノウイルスの存在下での感染性粒子の生成に導くことが可能な生体内での組換え及び繁殖のいずれかの危険をなくすものである。

従って、遺伝子治療におけるベクターとしてのウイルスの使用に固有な危険がいっそう低いため、アデノウイルスの又は動物起源のアデノウイルス領域の使用は特に有利である。

本発明の枠組内で使用できる動物起源のアデノウイルスは、イヌ、ウシ、ネズミ、（例：Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81）、ヒツジ、ブタ又はトリ又はサル（例：SAV）のものである。より詳細には、トリのアデノウイルスの中では、ATCCで入手可能な血清型1～10、例えば株フェルプス [PHELPS (ATCC VR-432)]、フォンテス [Fontes (ATCC VR-280)]、P7-A (ATCC VR-827)、IBH-2A (ATCC VR-828)、J2-A (ATCC VR-

829)、T8-A (ATCC VR-830)、K-11 (ATCC VR-921) 又はATCC VR-831～835で寄託されている株を挙げることができる。ウシのアデノウイルスの中では、種々の公知の血清型が使用でき、特に、寄託番号ATCC VR-313、314、639～642 768及び769下でATCC (1～8型)で入手可能なものが使用できる。また、ネズミのアデノウイルスFL (ATCC VR-550) 及びE20308 (ATCC VR-528)、5型 (ATCC VR-1343)、又は6型 (ATCC VR

ー1340) ヒツジのアデノウイルス; ブタのアデノウイルス 5359)、あるいは特に番号 VR-591~594、941~943、195~203などの下でATCCに寄託されているアデノウイルスも挙げられる。

好ましくは、動物起源の種々のアデノウイルスの中では、イヌ起源のアデノウイルス又はアデノウイルス領域、ならびにすべてのCAV2アデノウイルス株[例えばマンハッタン (manhattan) 又はA26/61株(ATCC VR-800)]が本発明の枠組内で用いられる。イヌのアデノウイルスは数多くの構造研究のテーマとなってきた。従って、CAV1及びCAV2アデノウイルスの完全な制限酵素地図が先行技術に記載されている (Spibey et al., J. Gen. Virol., 70 (1989) 165)、そしてE1a及びE3遺伝子ならびにITR配列がクローン化されそして配列決定されている (Spibey et al., Virus Res. 14 (1989) 241; Linne, Virus Res 23 (1992) 119, 国際公開第91/11525号を特に参照)。

上記で示されているように、本発明のアデノウイルスは異型DNA配列を含む。異型DNA配列は、標的細胞中における伝達及び/又は発現が望まれる組換えウイルスに導入されるいずれかのDNA配列を意味する。

特に、異型DNA配列は1種以上の治療性遺伝子及び/又は抗原性ペプチドをコード化する1種以上の遺伝子を含むことができる。

このように伝達されることができる治療性遺伝子は、標的細胞中における転写及び場合により翻訳が、治療作用を有する生成物を生産するいずれかの遺伝子である。

これは、特に、治療効果を有する蛋白質産物をコード化する遺伝子であり得る。このようにしてコード化された蛋白質産物は、蛋白質、ペプチド、アミノ酸などであり得る。この蛋白質産物は、標的細胞に関して同型であってよい(すなわち、後者が病状を示さない場合、通常標的細胞中に発現される生成物)。この場合、蛋白質の発現は、例えば、細胞中における不十分な発現又は修飾の結果としての不活性なもしくは活性の弱い蛋白質の発現を軽減すること、あるいは前記蛋

白質を過剰に発現することを可能にする。治療性遺伝子は、また、増大した安定性、修飾活性などを有する細胞蛋白質の突然変異をコード化できる。蛋白質生成物もまた標的細胞に関して異型であってよい。この場合、発現された蛋白質は、例えば、細胞に不足している活性を補うかあるいは与えることができ、病状に打ち勝つことを可能にする。

本発明の目的のための治療性産物の中で、より詳細には、酵素、血液誘導剤、ホルモン、リンホカイン：インターロイキン、インターフェロン、TNFなど（FR第9203120号）、成長因子、神経伝達物質

又はそれらの前駆体又は合成酵素、栄養因子（BDNF、CNTF、NGF、IGF、GMF、aFGF、bFGF、NT3、NT5など）、アポリポ蛋白質（ApoA I、ApoA I V、ApoEなど（FR第93 05125号））、ジストロフィン（dystrophin）又はミニジストロフィン（minidystrophin）（FR第9111947号）、腫瘍サプレッサー遺伝子：p53、Rb、RaplA、DCC、k-rvなど（FR第93 04745号）、凝固に関与する因子（VII、VIII、IX因子など）をコード化する遺伝子が挙げられる。

治療性遺伝子は、また、標的細胞中における発現が遺伝子の発現又は細胞mRNAの転写の制御を可能ならしめるアンチセンス遺伝子又は配列であり得る。欧州特許第140 308号に記載されている技術に従い、そのような配列は、標的細胞中で例えば細胞mRNAに補足的なRNAに転写され、そしてその結果それらの蛋白質への翻訳を妨害する。

上記で示されているように、異型DNA配列はまたヒトに微生物又はウイルスに対する免疫応答を生じさせることが可能な病原性ペプチドをコード化する1種以上の遺伝子を含むことができる。従って、この特定の実施態様では、特に微生物又はウイルスに対してヒトを免疫化できるワクチンの生産を許容する。それらは、特に、エプスタインバールウイルス、HIVウイルス、B型肝炎ウイルス（欧州特許第185 573号）、仮性狂犬病ウイルスに対して特異的なあるいは腫瘍（欧州特許第259 212号）に対して特異的な抗原性ペプチドをコード

化する抗原性ペプチドであり得る。

一般に、異型DNA遺伝子は、また、感染細胞中で治療性遺伝子及び

／又は抗原性ペプチドをコード化する遺伝子の発現を許容する配列を含む。それら配列が感染細胞を機能させることが可能である場合、当然考慮されている遺伝子の発現の原因となる配列があつてよい。それらはまた異なる起源の配列であり得る（他の蛋白質又は合成品ですらの発現の原因となる）。特に、それらは真核性又はウイルス遺伝子のプロモーター配列であり得る。例えば、それらは感染することが望まれる細胞のゲノムから誘導されるプロモーター配列であり得る。同様に、それらは用いるアデノウイルスを含むウイルスのゲノムから誘導されるプロモーター配列であり得る。この点について、例えばE1A、MLP、CMV及びRSV遺伝子などのプロモーターが挙げられる。加えて、それら発現配列は活性化配列、調節配列などの付加により修飾できる。さらに、挿入された遺伝子が発現配列を含まない場合、それはそのような配列の下流の欠陥ウイルスのゲノムに挿入できる。

さらに、異型DNA遺伝子はまた、特に、治療性遺伝子上流に、標的細胞の分泌経路で合成される治療性産物に向けられるシグナル配列を含むことができる。このシグナル配列は治療性産物の自然シグナル配列であり得るが、しかしそれはまた他の機能性シグナル配列あるいは人工シグナル配列であり得る。

上記で示されたように、本発明のベクターは少なくとも1種の非機能的なE2、E4及びL1～L5遺伝子を有する。考慮されているウイルス遺伝子は当業者に公知のいずれかの技術により、及び特に考慮されている遺伝子の1種以上の塩基のサプレッション、置換欠陥又は付加により非機能的にされ得る。そのような修飾は、生体外で（単離されたDNA上）あるいはインシトゥで、例えば遺伝子工学技術により又は突然変

異誘発剤を用いる処理により得ることができる。

突然変異誘発剤の中では、エネルギー線（X-、 γ -及び紫外線）のような物理剤、又はDNAの塩基の種々の官能基と反応し得る化学剤、例えばアルキル化

剤〔エチル メタンスルホネート (EMS)、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、N-ニトロキノリン-1-オキシド (NQO)〕、バイアルキル化剤、内位添加剤などが挙げられる。

本発明の目的上、欠失とは、考えられている遺伝子のいずれかのサプレッションと理解されている。これは、特に前記遺伝子のコード領域のすべて又は一部、及び／又は前記遺伝子の転写のためのプロモーター領域のすべて又は一部であり得る。サプレッションは、実施例で例証されるように、常用の分子生物学的技術に従い、適宜な制限酵素による消化によりそして引き続く連結反応により行うことができる。

遺伝子修飾は、また、遺伝子破壊により、例えば Rothstein [Meth. Enzymol. 101 (1983) 202] によりはじめに述べられた方法に従って得られる。この場合、好ましくは、同型組換えによりゲノム配列を非機能的又は突然変異配列に置換できるように、コード化配列のすべて又は一部がかき乱される。

前記遺伝子修飾は、関連遺伝子のコード化部位に、あるいはコード化領域外にならびに例えば前記遺伝子の発現及び／又は転写調節の原因となる領域に、位置することができる。従って、構造又はコンホメーションの修飾による不活性な蛋白質の生産により、生産されないことにより、変換された活性を有する蛋白質の生産により、あるいは低減されたレベルの又は望ましい調節方法による自然蛋白質の生産により、前記遺伝子

の非機能性はそれ自体で明らかになる。

さらに、点突然変異のようないくつかの変性は、本来、細胞メカニズムにより修正され又は低減されることが可能である。そこで、そのような遺伝子の変性は、工業規模では限られた興味しか持たれない。従って、非機能性は分離上及び／又は非可逆的に完全に安定であることが特に好ましい。

好ましくは、部分的又は完全な欠失のために遺伝子は非機能的である。

好ましくは、本発明の欠陥組換えアデノウイルスは後期遺伝子のアデノウイルスを含まない。

本発明の特に有利な態様は、

- I T R 配列、
- 被包を許容する配列、
- 異型DNA配列、及び
- E 2 遺伝子又はその一部を担持する領域

を含む欠陥組換えアデノウイルスにある。

本発明の特に有利な別の態様は、

- I T R 配列、
- 被包を許容する配列、
- 異型DNA配列、及び
- E 4 遺伝子又はその一部を担持する領域

を含む欠陥組換えアデノウイルスにある。

さらに特に有利な態様において、本発明のベクターは、異型プロモーターの制御の下に機能的な E 3 遺伝子を担持する。特に好ましくは、ベクターは蛋白質 g p 1 9 K の発現を許容する E 3 遺伝子の一部を担持す

る。

本発明に従う欠陥組換えアデノウイルスは種々の方法で調製できる。

第一の方法は、生体外で（連結結合により又はプラスミド形態でのいずれかで）調製された欠陥組換えウイルスからのDNAをコンピテント細胞系にトランスフェクションすること、すなわち欠失ウイルスの補足に必要なすべての機能をトランス状態で帯びさせることにある。それらの機能は、好ましくは細胞のゲノムに組み込まれ、このことは組換えの危険を回避することを可能にし、細胞系に増大した安定性を与える。そのような細胞系の調製は実施例中に記述されている。

第二の方法は、（連結結合により又はプラスミド形態でのいずれかで）生体外で調製された欠陥組換えウイルスからのDNA、及びヘルパーウイルスからのDNAを適宜な細胞系に同時トランスフェクションすることにある。この方法に従えば、組換えアデノウイルスのすべての欠陥機能を補足できるコンピテント細胞系を有する必要がない。それら機能の一部は実際にヘルパーウイルスにより補

足される。このヘルパーウイルスはそれ自体欠陥性であるべきであり、そして細胞系はその補足に必要な機能をトランス状態で有する。この方法に従う本発明の欠陥組換えアデノウイルスの調製も実施例で例証されている。

第二の方法の枠組内で用いることができる細胞系の中では、特に、ヒト腎臓胚293系、KB細胞、HeLa、MDCK及びGHK細胞などが挙げられる（実施例参照）。

次に、増殖したベクターは、常用の分子生物学的技術に従い、回収され、精製されそして増幅される。

従って、本発明は、また、それらのゲノムに組み込まれた状態で上述

したような欠陥組換えアデノウイルスの補足に必要な機能を含むアデノウイルスに感染できる細胞系に関する。特に、それはそれらのゲノムに組み込まれた状態で、E1及びE2領域（特に72K蛋白質をコード化する領域）及び／又はE4及び／又はグルコシルコイドレセプターに関する遺伝子に関する。好ましくは、それらの系列は293又はgmDBP6系列から得られる。

本発明は、また、上述したような1種以上の欠陥組換えアデノウイルスを含むいずれかの製薬組成物に関する。本発明の製薬組成物は、局所的、経口的、非経口的、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下、眼内及び経皮的投与等用に調剤することができる。

好ましくは、製薬組成物は注射製剤用に薬学上許容できる賦形剤を含む。それらは、特に、塩水（硫酸ナトリウム又は二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウム又はマグネシウムなどあるいはそのような塩の混合物）、滅菌又は等張溶液、あるいは乾燥、特に凍結乾燥組成物であり、さらに場合に応じて滅菌水又は生理食塩水は注射溶液の構成を許容する。

注射に用いるウイルス用量は、種々のパラメーターに応じて、特に用いる投与態様、関連病状、発現すべき遺伝子又は望まれる治療期間に応じて、修正して適応することができる。一般に、本発明の組換えアデノウイルスは、 $10^4 \sim 10^{10}$ p f u / m l、及び好ましくは $10^6 \sim 10^{10}$ p f u / m lの間の用量の形態で調剤されそして投与される。述語「p f u（プラーク形成単位）」はウイルス溶

液の感染能に対応し、そして適宜な細胞培養物に感染させ次いで一般に5日後に感染細胞のプラークを測定することにより、測ることができる。ウイルス溶液の p f u 力価

の測定技術は文献中に詳しく記載されている。

挿入される異型DNA配列に応じて、本発明のアデノウイルスは、遺伝病（ジストロフィー、嚢胞性線維症など）、神経病（アルツハイマー、パーキンソン、ALSなど）、癌、凝固異常及び異常リポ蛋白質血症に関連する病状、ウイルス感染（肝炎、AIDSなど）に関連する病状を含む数多くの病状の治療又は予防に用いることができる。

本発明は、例証的でありそして非制限的であるものとして考えるべき以下の実施例の助けにより、より詳細に記述される。

図面の説明

図1：Ad5アデノウイルスの遺伝子構成。Ad5の完全配列がデータベースにより入手でき、そして当業者がいずれかの制限部位を選択し又は作りそしてその結果ゲノムのいずれかの領域を単離することを可能ならしめる。

図2：（上記で引用したSpibey et al. に従い）CAV2アデノウイルスマンハッタン株の制限酵素地図。

図3：連結反応による本発明の欠陥ウイルスの構築。

図4：E4遺伝子を担持する組換えウイルスの構築。

図5：E2遺伝子を担持する組換えウイルスの構築。

図6：プラスミドpPY32の構築及び表示。

図7：プラスミドpPY55の表示。

図8：プラスミドp2の表示。

図9：プラスミドpITRL5-E4の構築に用いる中間プラスミドの表示。

図10：プラスミドpITRL5-E4の表示。

一般的な分子生物学的技術

例えばプラスミドDNAの分離抽出、塩化セシウム勾配中におけるプラスミド

DNAの遠心分離、アガロース又はアクリルアミドゲル上の電気泳動、電気溶離によるDNA断片の精製、フェノール又はフェノール/クロロホルムを用いる蛋白質抽出、エタノール又はイソプロパノールを用いる塩水媒体中のDNA沈殿、大腸菌中における形質転換などのような分子生物学で用いられる常法は、当業者に周知であり、そして文献中に幅広く記載されている [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982; Ausubel F. M. et al., (ed), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987]。

pBR322及びpUC型プラスミドならびにM13系列のファージは市販品である (Bethesda Research Laboratories)。

連結反応では、供給者の推奨に従い、DNA断片をそれらの大きさに応じてアガロース又はアクリルアミドゲル上の電気泳動により精製し、フェノール又はフェノール/クロロホルム混合液を用いて抽出し、エタノールで沈殿し、そしてファージT4 DNAリガーゼ (Bio Lab) の存在下でインキュベートする。

突出5'末端の充填は、供給者の仕様書に従い、大腸菌のDNAポリ

メラーゼIのクレノー断片 (Bio Labs) を用いて行うことができる。突出3'末端の破壊は、製造者の推奨に従い、用いられるファージT4 DNAポリメラーゼ (Bio Labs) の存在下に行われる。突出5'末端の破壊は、S1ヌクレアーゼを用いて制御された処置により行われる。

合成オリゴデオキシリボヌクレオチドを用いる生体外での特定部位の突然変異誘発は、アマシャム (Amersham) により分配されるキットを用いてタイラー等 (Taylor et al.) により開発された方法 [Nucleic Acid Res. 13 (1985) 8749-8764] に従い行うことができる。

いわゆるPCR技術 [Polymerase-catalyzed Chain

Reaction, Sakai R. K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K. B. and Faloona F. A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] によるDNA断片の酵素的増幅は、製造者の仕様書に従い、「DNA熱サイクラー」(Perkin Elmer Cetus)を用いて行うことができる。

ヌクレオチド配列の確認はアマシャム(Amersham)により分配されるキットを用いてサンガー等(Sanger et al.)により開発された方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467]により行われる。

細胞系

以下の実施例では、以下の細胞系を用いたかあるいは用いることができる。

— ヒト腎臓胚293系(Graham)。この系列は特にそのゲノムに組み込まれた状態でヒトのアデノウイルスAd5のゲノムの左部分(12%)を含む。

— ヒト細胞系KB: ヒト表皮性癌腫から誘導され、この系列はATCC(表示CCL17)で及びその培養を許容する条件で入手できる。

— ヒト細胞系Hela: ヒト上皮の癌腫から誘導され、この系列はATCC(表示CCL2)で及びその培養を許容する条件で入手できる。

— イヌ細胞系MDCK: MDCK細胞の培養条件は、特にマッカトニー等[Macatney et al., Science 44 (1988) 9]に記載されている。

— 細胞系 gm DBP6(Brough et al., Virology 190 (1992) 624))。この系列は、MMTVのLTRの制御下にアデノウイルスE2遺伝子を担持するHela細胞からなる。

実施例

実施例1

ウイルス遺伝子のほとんどを欠失している組換えアデノウイルスの可能性を例

証する。そのために、一連のアデノウイルスの欠失変異体を生体外での連結反応により構築し、そしてそれら変異体のそれぞれをヘルパーウイルスを用いてKB細胞中に同時トランスフェクションした。それら細胞はE1欠陥のウイルスの増殖を許容しないので、トランス補足 (trans complementation) がE1領域に施される。

種々の欠失変異体をAd5アデノウイルスから、消化及び次なる生体外での連結反応により調製した。そのために、Lipp et al.,

(J. Virol. 63 (1989) 5-133) により記載されている技術により、Ad5からのウイルスDNAを単離し、種々の制限酵素の存在下で消化に供し (図3参照)、そして次に消化産物をT4 DNAリガーゼの存在下で連結した。次に種々の欠失変異体を0.8% SDS-アガロースゲル上で確認した。次にそれらの欠失変異体をマッピングした (図3参照)。

mt1: Ad5断片0-20642 (SauI) と (SauI) 33797-35935の間の連結。

mt2: Ad5断片0-19549 (NdeI) と (NdeI) 31089-35935の間の連結。

mt3: Ad5断片0-10754 (AatII) と (AatII) 25915-35935の間の連結

mt4: Ad5断片0-11311 (MluI) と (MluI) 24392-35935の間の連結。

mt5: Ad5断片0-9462 (SalI) と (XhoI) 29791-35935の間の連結。

mt6: Ad5断片0-5788 (XhoI) と (XhoI) 29791-35935の間の連結。

mt7: Ad5断片0-3665 (SphI) と (SphI) 31224-35935の間の連結。

上述のように調製した各々の変異体を、硫酸カルシウムの存在下、Ad. RS V β Gal (Stratford-Perricaudet et al., J.

Clin. Invest. 90 (1992) 626) からのウイルスDNAを用いてKB細胞中に同時トランスフェクション

した。トランスフェクションから8日後に細胞を捕捉し、そして培養物上澄みを捕捉し、そして次に各々のトランスフェクションにつき50皿のストックが得られるまでKB細胞上で増幅させた。それぞれの試料からエピソームDNAを単離しそして塩化セシウム勾配上で分離した。それぞれの場合、2本の明瞭なウイルス帯が観察されたが、それを集めてそして分析した。より重いものがAd. RSV β GalからのウイルスDNAに対応し、そしてより軽いものが連結反応により生産された組換えウイルスからのDNAに対応する(図3)。後者の得られた力価は約 10^8 p f u / m l である。

アデノウイルス欠失変異体の第二の系列を同一方法に従い、生体外での連結反応により構築した。それらの種々の変異体は以下の領域を担持する。

mt 8: 断片Ad RSV β Galからの0-4623 (Apa I) とAd 5からの (Apa I) 31909-35935の間の連結。

mt 9: 断片Ad RSV β Galからの0-10178 (Bgl II) とAd 5からの (BamHI) 21562-35935の間の連結。

次にRSVウイルスのLTRプロモーターの制御下でLacZ遺伝子を担持するそれらの変異体を、E4領域が欠失しているH2d1808 (Weinberg et al., J. Virol. 57 (1986) 833) の存在下で細胞293中に同時トランスフェクションした。この第二の方法に従えば、トランス補足がE4に施されるが、もはやE1には施されない。従って、上述したように、この技術はウイルス遺伝子としてE4領域のみを担持する組換えウイルスを生産することができる。

実施例2

この実施例は、ヘルパーウイルスを用いてプラスミド中に導入された組換えウイルスのDNAを同時トランスフェクションすることによる本発明に従う欠陥組換えアデノウイルスの調製を記述する。

そのために、A d 5の連結 I T R、被包配列、それ自身のプロモーターの制御下でのE 4遺伝子、及び異型遺伝子としての、R S VウイルスのI T Rプロモーターの制御下でのL a c Z遺伝子を担持するプラスミドを構築した(図4)。

p E 4 G A 1と表示されるこのプラスミドを以下の断片のクローン化及び連結反応により得た(図4参照)。

- プラスミド P F G 1 4 4 (G r a h a m e t a l. , E M B O J . 8 (1989) 2077) から誘導されるH i n d I I I - S a c I I断片。この断片はトランス状態でA d 5からのI T R配列及び被包配列を担持する：H i n d I I I (34920) - S a c I I (352)断片。

- S a c I I (塩基対3827のレベルに位置する)とP s t I (塩基対4245のレベルに位置する)部位間のA d 5からの断片、

- P s t I (b p 32)とS a I I (b p 34)部位間のp S P 72 (P r o m e g a)からの断片。

- S t r a t f o r d - P é r r i c a u d e t e t a l. (J C I 90 (1992) 626)に記載されているプラスミド p A d L T R G a I I XのX h o I - X b a I断片。この断片はR S VウイルスのL T Rの制御下でL a c Z遺伝子を担持する。

- プラスミド p S P 72のX b a I (b p 40) - N d e I (b p 2379)断片。

- A d 5からのN d e I (b p 31089) - H i n d I I I (34930)断片。この断片はA d 5のゲノムの右末端に位置し、それ自身のプロモーターの制御下にE 4領域を担持する。それをプラスミドp S P 72のN d e I部位(2379)及び第一の断片のH i n d I I I部位にクローン化した。

種々の断片をプラスミドp S Pの表示された領域中にクローン化することにより、このプラスミドを得た。同等の断片は当業者が他の材料源から得ることができるものと理解される。

次に硫酸カルシウムの存在下で、プラスミドp E 4 G a IをウイルスH 2 d 1 808からのD N Aを用いて細胞293中に同時トランスフェクションする。

次に組換えウイルスを実施例1の記載通りに調製する。このウイルスは唯一のウイルス遺伝子としてAd5アデノウイルスからのE4遺伝子を担持する(図4)。そのゲノムは約12kbのサイズを有し、このことは非常に大きなサイズ(20kbまでの)の異型DNAの挿入を可能にする。従って、当業者はLacZ遺伝子を例えば上述したような他のいずれかの治療性遺伝子で容易に置換できる。さらに、このウイルスはプラスミドpSP 72から誘導されるいくつかの配列を担持するが、これは、必要に応じて、常用の分子生物学技術により除去できる。

実施例3

この実施例は、ヘルパーウイルスを用いてプラスミド中に導入された組換えウイルスDNAを同時トランスフェクションすることによる本発明に従う別の欠陥組換えアデノウイルスの調製を記述する。

そのために、Ad5の連結ITRs、被包配列、それ自身のプロモーターの制御下でのAd2からのE2遺伝子、及び異型遺伝子としての、RSVウイルスのITRのプロモーターの制御下でのLacZ遺伝子を担持するプラスミドを構築した(図5)。pE2Galと表示されたこのプラスミドを以下の断片のクローニング及び連結反応により得た(図5参照)。

— プラスミド PFG144 (Graham et al., EMBO J. 8 (1989) 2077) から誘導されるHindIII-SacII断片。この断片はトランス状態でAd5からのITR配列及び被包配列を担持する: HindIII (34920) - SacII (352) 断片。以下の断片を用いて、それをプラスミドpSP 72のHindIII (16) - PstI (32) 部位中にクローニングした。

— SacII (塩基対3827のレベルに位置する) とPstI (塩基対4245のレベルに位置する) 部位間のAd5からの断片。この断片を前述の断片のSacII部位及びプラスミドpSP 72のPstI部位中にクローニングした。

— PstI (bp 32) とSalI (bp 34) 部位の間のpSP72

(P r o m e g a) の断片。

— S t r a t f o r d - P e r r i c a u d e t e t a l. (J C I 90 (1992) 626) に記載されているプラスミド p A d L T R G a l I I X の X h o I - X b a I 断片。この断片は R S V ウイルスの L T R の制御下で L a c Z 遺伝子を担持する。それをプラスミド p S P 7 2 の S a I I (34) 及び X b a I 部位中にクローン化した。

— X b a I (b p 34) と B a m H I (b p 46) 部位間の p

S P 7 2 (P r o m e g a) の断片。

— A d 2 の B a m H I (b p 21606) と S m a I (b p 27339) 断片。この A d 2 ゲノムの断片はそれ自身のプロモーターの制御下で E 2 領域を担持する。それをプラスミド p S P 7 2 の B a m H I (b p 46) 及び E c o R V 部位中にクローン化した。

— プラスミド p S P 7 2 の E c o R V (b p 81) と H i n d I I I (b p 16) 断片。

種々の断片をプラスミド p S P 7 2 の表示された領域中にクローン化することにより、このプラスミドを得た。同等の断片は当業者が他の材料源から得ることができるものと理解される。

次に、硫酸カルシウムの存在下で、プラスミド p E 2 G a l を E 2 領域を欠損している H 2 d 1 8 0 2 ウイルスからの DNA (R i c e e t a l. , J. V i r o l. 56 (1985) 767) を用いて細胞 293 中に同時トランスフェクションする。次に組換えウイルスを実施例 1 の記載通りに調製する。このウイルスは唯一のウイルス遺伝子として A d 2 アデノウイルスからの E 2 遺伝子を担持する (図 5)。そのゲノムは約 12 k b のサイズを有し、このことは非常に大きなサイズ (20 k b までの) の異型 DNA の挿入を可能にする。従って、当業者は L a c Z 遺伝子を例えば上述したような他のいずれかの治療性遺伝子で容易に置換できる。さらに、このウイルスは中間プラスミドから誘導されるいくつかの配列を担持するが、これは、必要に応じて、常用の分子生物学技術により除去できる。

実施例 4

この実施例は、アデノウイルスの E 1、E 2 及び／又は E 4 領域に関

する補足細胞系の構築を記述する。それらの系はヘルパーウイルスに頼らないで、それら領域が欠失している本発明に従う組換えアデノウイルスの構築を可能にする。それらウイルスは生体内的組換えにより得られ、そして主要な異型配列を含んでいてもよい。

記述された細胞系では、潜在的に細胞毒性である E 2 及び E 4 領域は以下の誘導プロモーターの制御下に位置されている：

P N A S 90 (1993) 5603 に記載されている自然又は最小形態のいずれかの、デキサメタゾンにより誘導される M M T V (P h a r m a c i a) の L T R、あるいは G o s s e n 及び B u j a r d により記述されているテトラサイクリン抑制系。

他のプロモーター、特に例えば異型調節領域（特に「エンハンサー」領域）を担持する M M T V からの L T A 変形を用いることができると理解すべきである。本発明の系列は、硫酸カルシウムの存在下、対応する細胞を転写プロモーター及びターミネーター（ポリアデニル化部位）の制御の下に表示された遺伝子（アデノウイルス領域及び／又はグルココルチコイドレセプターに関する遺伝子）を担持する D N A 断片を用いてトランスフェクションすることにより構築された。ターミネーターはトランスフェクションされた遺伝子の自然ターミネーターであってもあるいは例えば S V 40 ウイルスの初期メッセンジャーのターミネーターのような異なるターミネーターであってもよい。

有利には、D N A 断片は形質転換された細胞の選択を可能にする遺伝子、例えばジェネチシンに対して耐性な遺伝子をも担持する。薬剤耐性遺伝子は前者と同時にトランスフェクションされた異なる D N A 断片によっても担持され得る。

トランスフェクション後、形質転換された細胞を選択し、ゲノム中への D N A 断片の組み込みを確認するためにそれらの D N A を分析する。

この技術は以下の細胞系を得ることを可能にする。

1. MMTVのLTRの制御下でのAd5のE2領域の72K遺伝子を担持する細胞293。

2. MMTVのLTRの制御下でのAd5のE2領域の72K遺伝子、及びグルコシルコイドレセプターに関する遺伝子を担持する細胞293。

3. MMTVのLTRの制御下でのAd5のE2領域及びMMTVのLTRの制御下でのE4領域の72K遺伝子を担持する細胞293。

4. MMTVのLTRの制御下でのAd5のE2領域、MMTVのLTRの制御下でのE4領域の72K遺伝子及びグルコシルコイドレセプターのための遺伝子を担持する細胞293。

5. MMTVのLTRの制御下でのE4領域を担持する細胞293。

6. MMTVのLTRの制御下でのE4領域及びグルコシルコイドレセプターに関する遺伝子を担持する細胞293。

7. それら自身のプロモーターの制御下でのE1A及びE1B領域を担持する細胞 gm DBP6。

8. それら自身のプロモーターの制御下でのE1A及びE1B領域及びMMTVのLTRの制御下でのE4領域を担持する細胞 gm DBP。

実施例5

この実施例は、そのゲノムからE1、E3及びE4遺伝子が欠失している本発明に従う欠陥組換えアデノウイルスの調製を記述する。特に本

実施例及び実施例3で例証されている有利な態様に従えば、本発明の組換えアデノウイルスのゲノムは、少なくともE1及びE4遺伝子が非機能的であるように修飾されている。そのようなアデノウイルスは、まず第一に、異型遺伝子の大きな組込み能を有する。さらに、後期遺伝子の発現調節、後期核RNAの安定性、宿主細胞のたん白質の発現の消滅及びウイルスDNAの複製の効率に必要とされるE4領域が欠失しているため、それらベクターはかなり安全である。従ってそれらベクターはかなり低減した転写バックグラウンドノイズ及びウイルス遺伝子発現を有する。最後に、特に有利な態様では、それらベクターは野生型アデノウイルスと同等の力価で製造できる。

それらアデノウイルスは、A d 5アデノウイルスのゲノムの修飾された右部分を有するプラスミドp P Y 5 5から、ヘルパープラスミドを用いる同時トランスフェクションによるか（実施例1、2及び3も参照）あるいは補足系（実施例4）により調製された。

5. 1 プラスミドp P Y 5 5の構築

a) プラスミドp P Y 3 2の構築

A d 5アデノウイルスのゲノムの右末端に対応するプラスミドp F G 1 4 4のA v r I I - B c I I断片 [F. L. Graham et al. EMBO J. 8 (1989) 2077-2085] を、dam- コンテキスト (dam- context) から調製されたベクターp I C 1 9 HのX d a IとB a m H Iの間に、はじめにクローン化した。これはプラスミドp P Y 2 3を作出する。プラスミドp P Y 2 3の1つの有利な特徴は、ベクターp I C 1 9 Hの多重クローニング部位から得られるS a I I部位がユニークな状態に残され、そしてそれがA d 5アデノウイルスのゲノムの右末端のそ

ばに位置することである。次に、35-614位に位置するH a e I I I部位からのA d 5アデノウイルスのゲノムの右末端を含むプラスミドp P Y 2 3のH a e I I I - S a I I断片を、ベクターp I C 2 0 HのE c o R V及びX h o I部位間にクローン化した。これはプラスミドp P Y 2 9を作出する。このプラスミドの1つの有利な特徴は、ベクターp I C 2 0 Hの多重クローニング部位から得られるX b a I及びC l a I部位がクローン化の結果E c o R Y / H a e I I I結合のそばに位置することである。さらに結合は、dam+ コンテキストで今やメチル化が可能となつたC l a I部位にすぐ隣りの、ヌクレオチドコンテキスト (context) を修飾する。次に、A d 5アデノウイルスのゲノムのX b a I (30470) - M a e I I (32811)断片をdam- コンテキストから調製したプラスミドp P Y 2 9のX b a I及びC l a I部位の間にクローン化した。これはプラスミドp P Y 3 0を作出する。30556位に位置するS s t I部位から右末端までのA d 5アデノウイルスのゲノムの配列に対応するプラスミドp P Y 3 0のS s t I断片を、最終的にベクターp I C 2 0 HのS S t I部

位間にクローン化したが、これはプラスミド p P Y 3 1 を作出した。H i n d I I I 部位間に位置する挿入物のその制限酵素地図を図6に示す。

プラスミド p P Y 3 2 は、B g l I I I によるプラスミド p P Y 3 1 の消化、引き続き B a m H I による完全な消化及び次なる再連結反応の後に得られた。従って、プラスミド p P Y 3 2 は、プラスミド p P Y 3 1 の B a m H I 部位及び 3 0 8 1 8 位に位置する B g l I I I 部位の間に位置する A d 5 アデノウイルスのゲノムの欠失に対応する。プラスミド p P Y 3 2 の H i n d I I I 断片の制限酵素地図を図6に示す。プラスミ

ド p P Y 3 2 の1つの特徴は、それがユニークな S a l I 及び X b a I 部位を有することである。

b) プラスミド p P Y 4 7 の構築

A d 5 アデノウイルスのゲノムの B a m H I (2 1 5 6 2) - X b a I (2 8 5 9 2) 断片を、dam- コンテキストから調製されたベクター p l C 1 9 H の B a m H I 及び X b a I 部位の間に、はじめにクローン化したが、これはプラスミド p P Y 1 7 を作出する。従って、このプラスミドは、A d 5 アデノウイルスのゲノムの H i n d I I I (2 6 3 2 8) - B g l I I I (2 8 1 3 3) 断片を含むが、これをベクター p l C 2 0 R の H i n d I I I 及び B g l I I I 部位間にクローン化して、プラスミド p P Y 3 4 を作出できる。このプラスミドの1つの特徴は、多重クローニング部位から得られた B a m H I 部位が A d 5 アデノウイルスのゲノムの H i n d I I I (2 6 8 2 8) 部位のすぐ近くに位置することである。次に、プラスミド p P Y 1 7 から得られた A d 5 アデノウイルスのゲノムの B a m H I (2 1 5 6 2) - H i n d I I I (2 6 3 2 8) 断片をプラスミド p P Y 3 4 の B a m H I 及び H i n d I I I 部位間にクローン化したが、これはプラスミド p P Y 3 9 を作出する。次に、B a m H I (2 1 5 6 2) 及び B g l I I I (2 8 1 3 3) 部位間の A d アデノウイルスのゲノム部分を含む dam- コンテキストから調製した、プラスミド p P Y 3 9 の B a m H I - X b a I 断片を、dam- コンテキストから調製されたベクター p l C 1 9 H の B a m H I 及び X b a I 部位間にクローン化した。これはプラスミド p P Y 4 7 を作出するが、そ

の1つの有利な特徴は多重クローニング部位から得られたS a I I部位がH i n d I I I I部位の近くに位置することである(図7)。

c) プラスミドp P Y 5 5の構築

B a m H I (2 1 5 6 2) 部位からB g l I I I (2 8 1 3 3) 部位に伸びているA d 5 アデノウイルスのゲノム部分を含む、dam- コンテキストから調製されたプラスミドp P Y 4 7のS a I I-X b a I断片を、プラスミドp P Y 3 2のS a I I及びX b a I部位間にクローン化したが、これはプラスミドp P Y 5 5を作出する。このプラスミドを、E 3 領域(A d 5 アデノウイルスのゲノムの2 8 1 3 3位及び3 0 8 1 8位に位置するB g l I I I部位間の欠失)及び全E 4 領域(A d 5 アデノウイルスのゲノムのM a e I I (3 2 8 1 1)及びH a e I I I (3 5 6 1 4) 部位間の欠失)が少なくとも欠失している組換えアデノウイルスを作出するために、直接使用することができる。

5. 2 ヘルパーウイルスE 4を用いる細胞2 9 3中への同時トランスフェクションによる調製

原理は、E 4 領域を発現する「微小ウイルス」(ヘルパーウイルス)と少なくともE 3 及びE 4 が欠失している組換えウイルスの間のトランス補足に基づいている。それらのウイルスは、以下の方法に従い、生体外での連結反応によるかあるいは生体内での組換えの後に得られる。

(i) A d - d 1 3 2 4 ウイルスからのDNA (Thimmappaya et al., Cell 3 1 (1 9 8 2) 5 4 3) 及びプラスミドp P Y 5 5 (両者ともB a m H Iにより消化されている)をはじめに生体外で連結反応させ、そして次にプラスミドp E A G a I (実施例2に記述された)を用いて細胞2 9 3中に同時トランスフェクションする。

(ii) E c o R Iにより消化されたA d - d 1 3 2 4 ウイルスからのDNA 及びB a m H Iにより消化されたプラスミドp P Y 5 5を、プ

ラスミドp E 4 G a Iを用いて細胞2 9 3中に同時トランスフェクションした。

(iii) A d 5 アデノウイルスからのDNA及びプラスミド p P Y 5 5 (両者とも B a m H I により消化されている)を、連結反応させ、そして次にプラスミド p E 4 G a l を用いて細胞 2 9 3 中に同時トランスフェクションした。

(iv) E c o R I により消化された A d 5 アデノウイルスからのDNA及び B a m H I により消化されたプラスミド p P Y 5 5 を、p E A G a l を用いて細胞 2 9 3 中に同時トランスフェクションした。

方法 (i) 及び (ii) は、E 1、E 3 及び E 4 領域が欠失している組換えアデノウイルスを作出することを可能にし、方法 (iii) 及び (iv) は、E 3 及び E 4 領域が欠失している組換えアデノウイルスを作出することを可能にした。もちろん、E 1、E 3 及び E 4 領域が欠失しておりかつトランス遺伝子 (transgene) を発現する組換えウイルスを作出する目的で、方法 (i) 又は (ii) に従う A d - d 1 3 2 4 からのDNAの代わりに、E 1 領域が欠失しているがしかしいずれかのトランス遺伝子を発現する組換えウイルスからのDNAを用いることができる。

b) E 1 及び E 4 機能をトランス補足する細胞系による調製

原理は、例えば誘導性であるプロモーターの制御下に E 1 領域を発現し、そしてまた少なくとも A d 5 アデノウイルスの E 4 領域のオープンフレーム (open frames) O R F 6 及び O R F 6 / 7 を発現する系、例えば 2 9 3 系から誘導される細胞系が A d 5 アデノウイルスの E 1 及び E 4 領域の両者をトランス補足できると事実に基づいている。そのような系は実施例 4 に記載されている。

従って、E 1、E 3 及び E 4 領域が欠失している組換えウイルスは上述した方法に従い、生体外での連結反応によるかあるいは生体内での組換えにより得ることができる。少なくとも E 4 領域が欠失しているウイルスを作出するために用いる方法にかかわらず、細胞変性効果 (組換えウイルスの作出を示す) が用いた細胞中へのトランスフェクション後に得られた。次に、細胞を捕捉し、それらの上澄み中で3回の凍結-解凍サイクルにより粉碎し、そして次いで 1 0 分間 4 0 0 0 r p m で遠心分離した。次に、このようにして得た上澄みを新鮮細胞培養物 (方法 a) については細胞 2 9 3 及び方法 b) については E 4 領域を発現する細

胞293)上で増殖させた。次に、ウイルスをブランクから精製し、そしてそれらDNAをHirtの方法(以前に引用した)に従い分析する。次にウイルスストックを塩化セシウム勾配上で調製する。

実施例6

この実施例は、そのゲノムから、E1、E3、L5及びE4遺伝子が欠失している本発明に従う欠損組換えアデノウイルスの調製を記述する。L5領域は、細胞に対して極度に毒性なタンパク質である線維をコード化するため、それらベクターは特に有利である。

それらアデノウイルスは、Ad5アデノウイルスのゲノムの修飾された右部分を有するプラスミドp2から、種々のヘルパープラスミドを用いる同時トランスフェクションにより調製した。それらを、また、補足系により調製することもできる。

6.1 プラスミドp2の構築

このプラスミドはAd5アデノウイルスのゲノムのBamHI(21562)から右のすべての領域を含むが、これからE3、L5及びE4

遺伝子を有するXbaI(28592)及びAvrII(35463)部位間の断片が欠失している。プラスミドp2は、以下の断片をBamHIを用いて線状化されそして脱リン酸化されたプラスミドpIC19R中へのクローン化及び連結反応により得られた(参照図8)。

— BamHI(21562)及びXbaI(28592)部位間のAd5アデノウイルスのゲノムの断片、及び

— AvrII(35463)部位(BamHI適合性)からBclI部位までの、Ad5アデノウイルス(右ITRを含む)のゲノムの右末端

6.2 L5遺伝子を有するヘルパープラスミド(pITRL5-E4)の構築

ヘルパープラスミドpITRL5-E4は、トランス状態でE4及びL5遺伝子を提供する。それは、さらにAd2アデノウイルスのMLPプロモーターの制御下に線維をコード化するL5領域を含む、実施例2に記載されたプラスミドpE4Gallに対応する。プラスミドpITRL5-E4を以下の態様で構築した

(図9及び10)。

5' - 3' 方向にH i n d I I I部位、線維のA T G、及びA d 5 アデノウイルスのゲノムの3 1 0 8 9位に位置するN d e I 部位までの線維のコード化配列を含む5 8 b p オリゴヌクレオチドを合成した。このオリゴヌクレオチドの配列を5' - 3' 方向で以下に示す。

AAGCTTATGAAGCGCGCAAGACCGTCTGAAGATACCTTCAACCCCGTGTATCCATATG

5' のH i n d I I I 部位及び3' のN d e I 部位を一本線でアンダーラインし、線維のA T G を二重線でアンダーラインした。

M L P プロモーターと引き続くA d 2 アデノウイルスの3分節系リー

ダー (tripartite leader) の配列を含むS s p I - H i n d I I I をプラスミドp M L P 1 0 から単離した (Ballay et al., (1987) UCLA Symposia on molecular and cellular biology, New series, Vol 70, Robinson et al (Eds) New-York, 481)。この断片を、上述した5 8 b p オリゴヌクレオチドの、プラスミドp I C 1 9 R のN d e I 及びE c o R V 部位間に挿入し、中間プラスミドを得た (図9参照)。次に、プラスミドI T R L 5 - E 4 を作出するために、プラスミドp E 4 G a l (実施例2) の (平滑にされた) S a c I I - N d e I 断片を中間プラスミドのS s p I 及びN d d e I 部位間に導入した (図10)。

6. 3 E 1、E 3、L 5 及びE 4 領域の欠失を含む欠陥組換えアデノウイルスの調製

a) ヘルパーウイルスを用いる細胞2 9 3 中への同時トランスフェクションによる調製

原理は、L 5 領域あるいはE 4 及びL 5 領域を発現する「微小ウイルス」 (ヘルパーウイルス) と少なくともE 3、E 4 及びL 5 が欠失している組換えウイルスの間のトランス補足に基づいている。

それらのウイルスは、以下の方法に従い、生体外での連結反応によるかあるいは生体内での組換えの後に得られる。

(i) A d - d 1 3 2 4 ウイルスからのD N A (Thimmappaya et al., Cell

31 (1982)543) 及びプラスミド p 2 (両者とも B a m H I により消化されている) をはじめに生体外で連結反応させ、そして次にヘルパープラスミド p I T R L 5 - E 4 (実施例 6. 2. に記述された) を用いて細胞 2 9 3 中に同時トランスフェクションした。

(ii) E c o R V により消化された A d - d 1 3 2 4 ウイルスから

の DNA 及び B a m H I により消化されたプラスミド p 2 を、プラスミド p I T R L 5 - E 4 を用いて細胞 2 9 3 中に同時トランスフェクションした。

(iii) A d 5 アデノウイルスからの DNA 及びプラスミド p 2 (両者とも B a m H I により消化されている) を、連結反応させ、そして次にプラスミド p I T R L 5 - E 4 を用いて細胞 2 9 3 中に同時トランスフェクションした。

(iv) E c o R I により消化された A d 5 アデノウイルスからの DNA 及び B a m H I により消化されたプラスミド p 2 を p I T R L 5 - E 4 を用いて細胞 2 9 3 中に同時トランスフェクションした。

方法 (i) 及び (ii) は、E 1、E 3、L 5 及び E 4 領域が欠失している組換えアデノウイルスを作出することを可能にし、方法 (iii) 及び (iv) は、E 3、L 5 及び E 4 領域が欠失している組換えアデノウイルスを作出することを可能にする。もちろん、E 1、E 3、L 5 及び E 4 領域が欠失しておりかつトランス遺伝子を発現する組換えウイルスを作出する目的で、方法 (i) 及び (ii) に従う A d - d 1 3 2 4 からの DNA の代わりに E 1 領域が欠失しているがしかしいずれかのトランス遺伝子を発現する組換えウイルスからの DNA を用いることができる。

上述した方法は、また、実施例 4 に記載されているように、アデノウイルスの E 1 及び E 4 領域を発現できる細胞系を使用して、L 5 領域のみを担持するヘルパーウイルスを用いて、使用することができる。

さらに、ヘルパーウイルスの使用を完全に回避するために、E 1、E 4 及び L 5 領域を発現できる補足系を使用することも可能である。

トランスフェクション後に、実施例 5 に記載した条件下、生産したウ

ウイルスを回収し、増幅しそして精製する。

【図1】

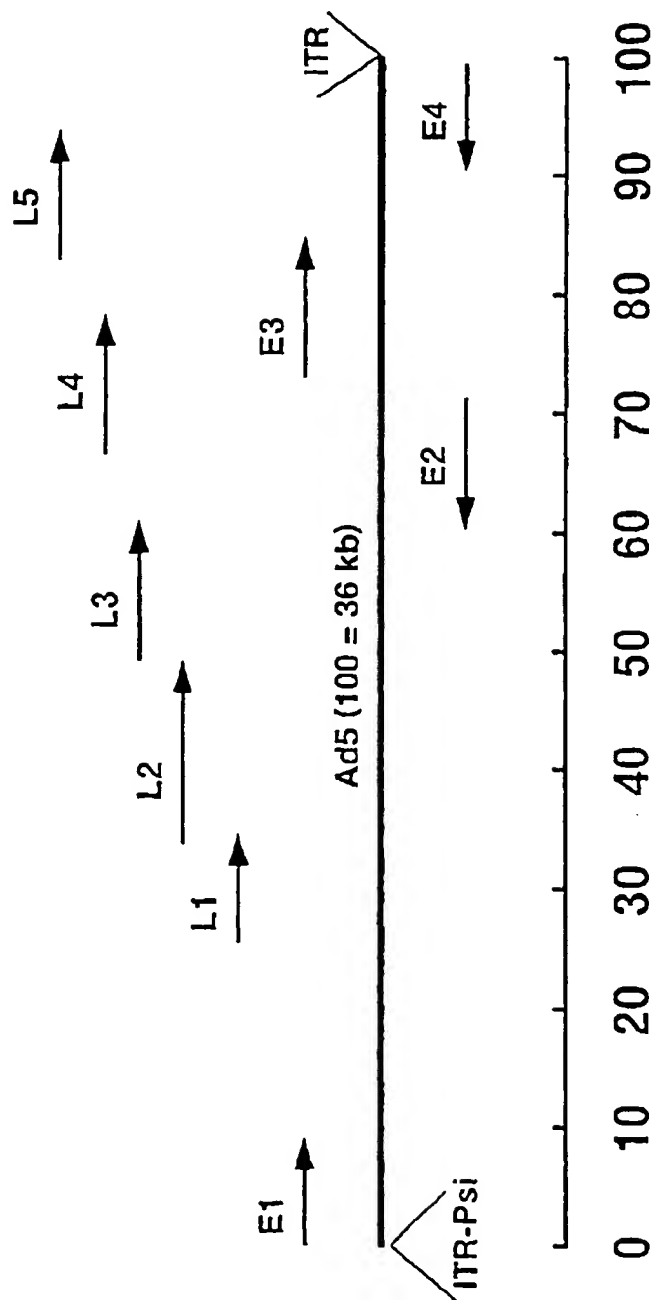


Figure 1

【図2】

C J K A G E I F B D H Pst I

A B Sal I

I C E F G H A B D J Sma I

Figure 2

【図3】

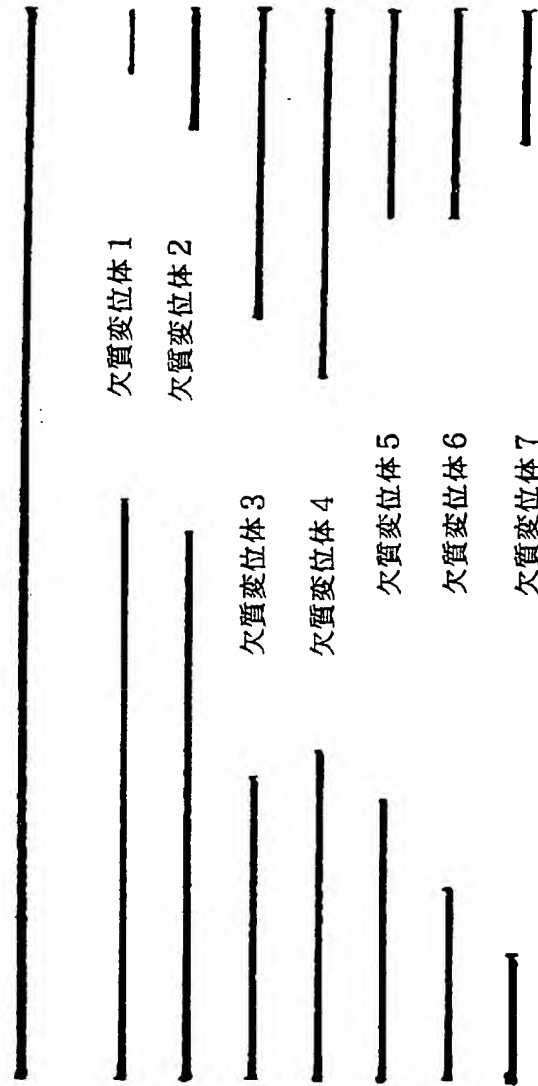
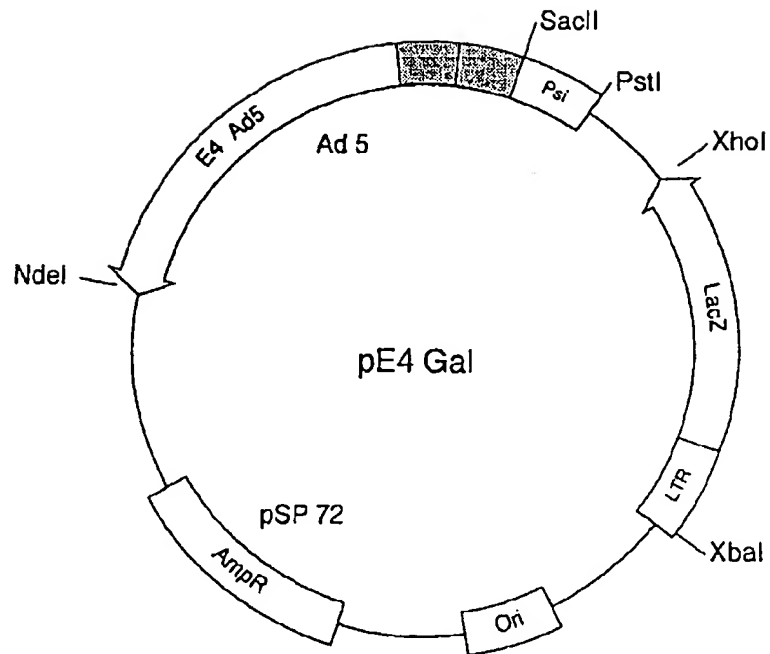


Figure 3

【図4】



X

H2d1808

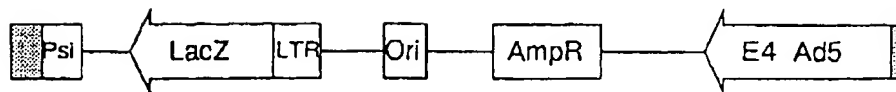


Figure 4

【図5】

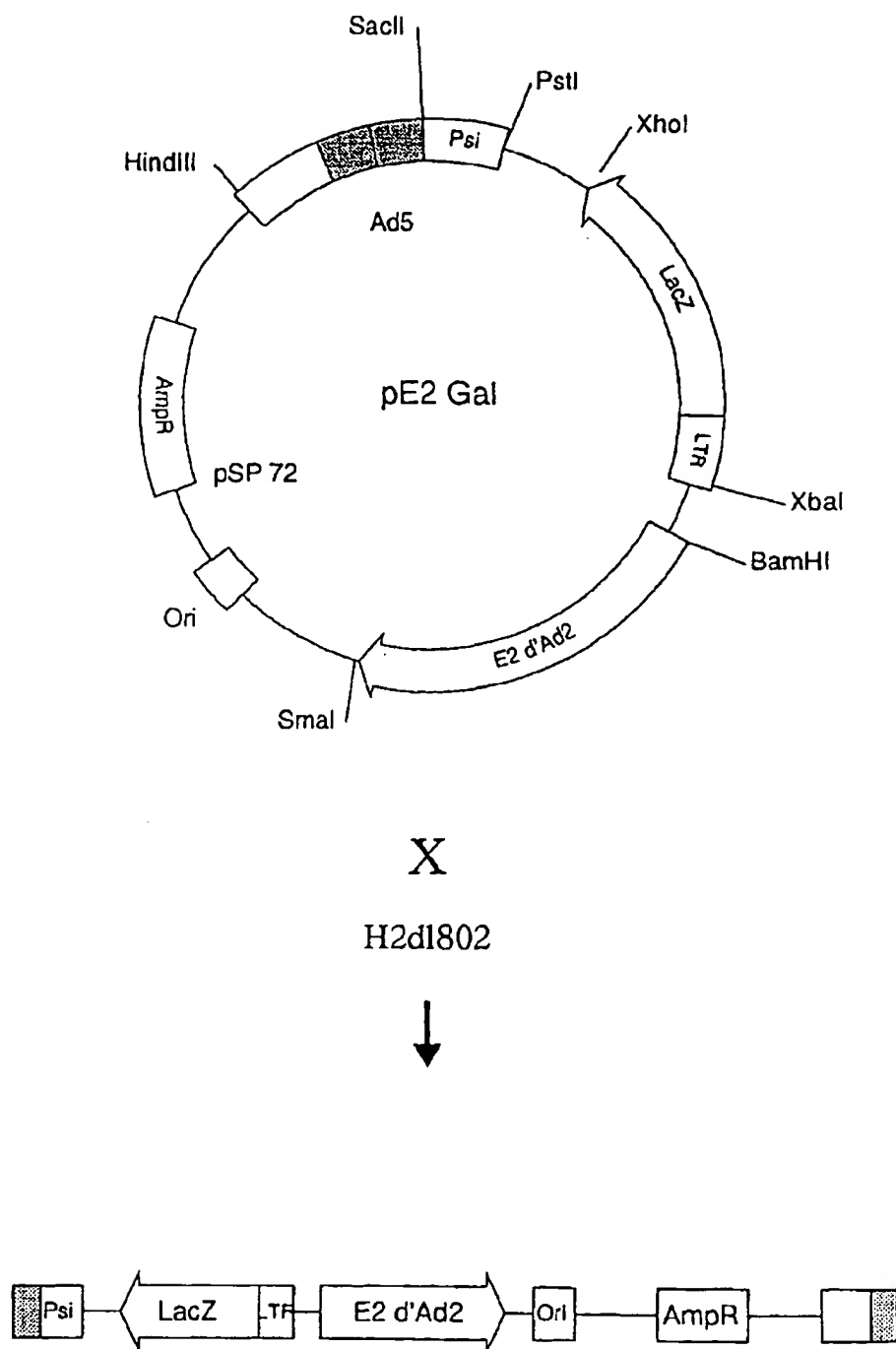


Figure 5

【図6】

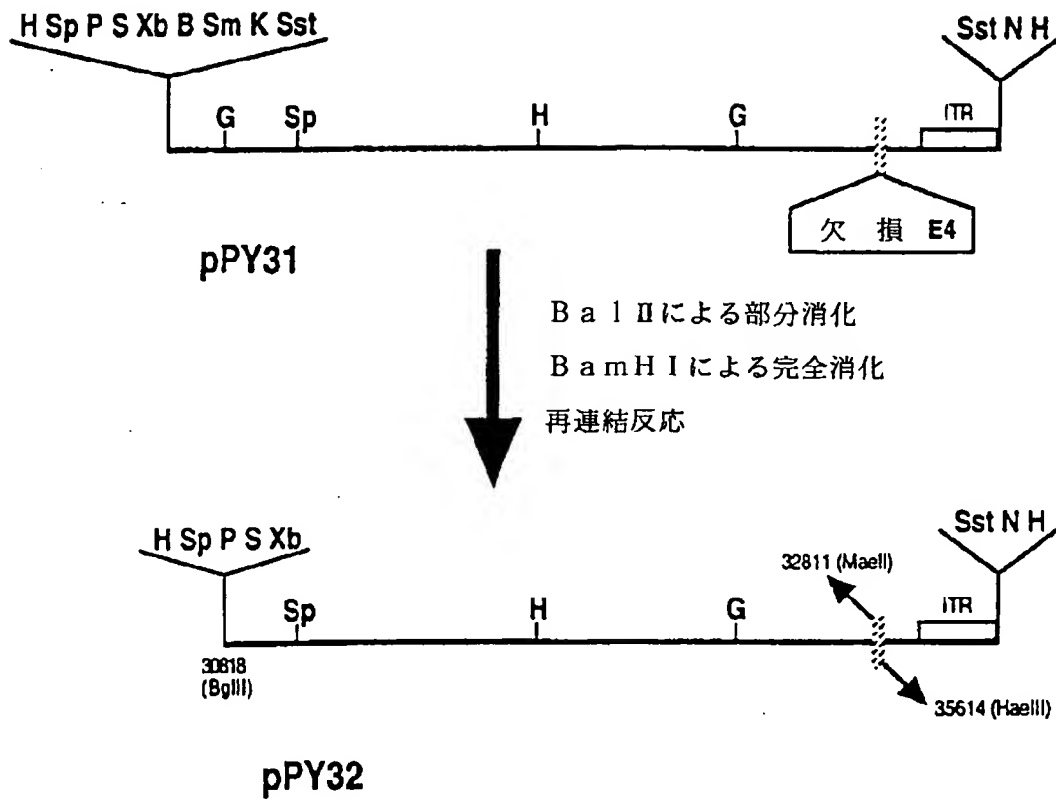


Figure 6

【図 7】

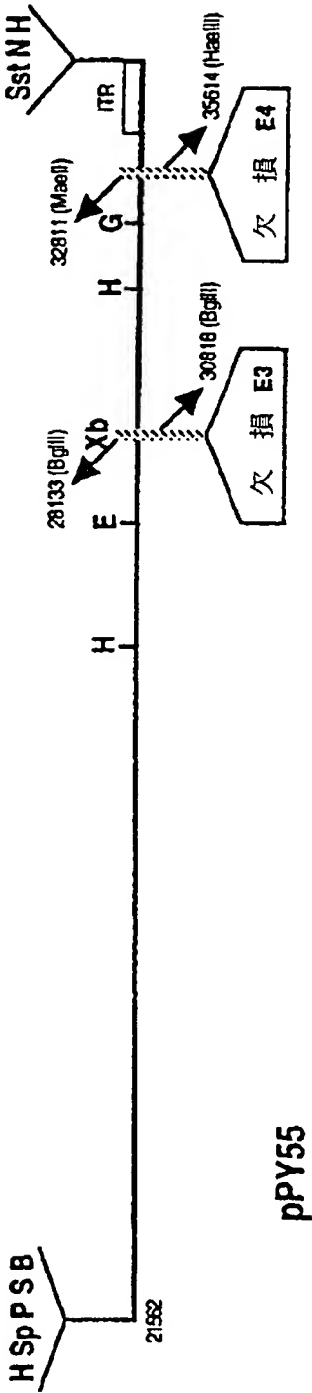


Figure 7

【図8】

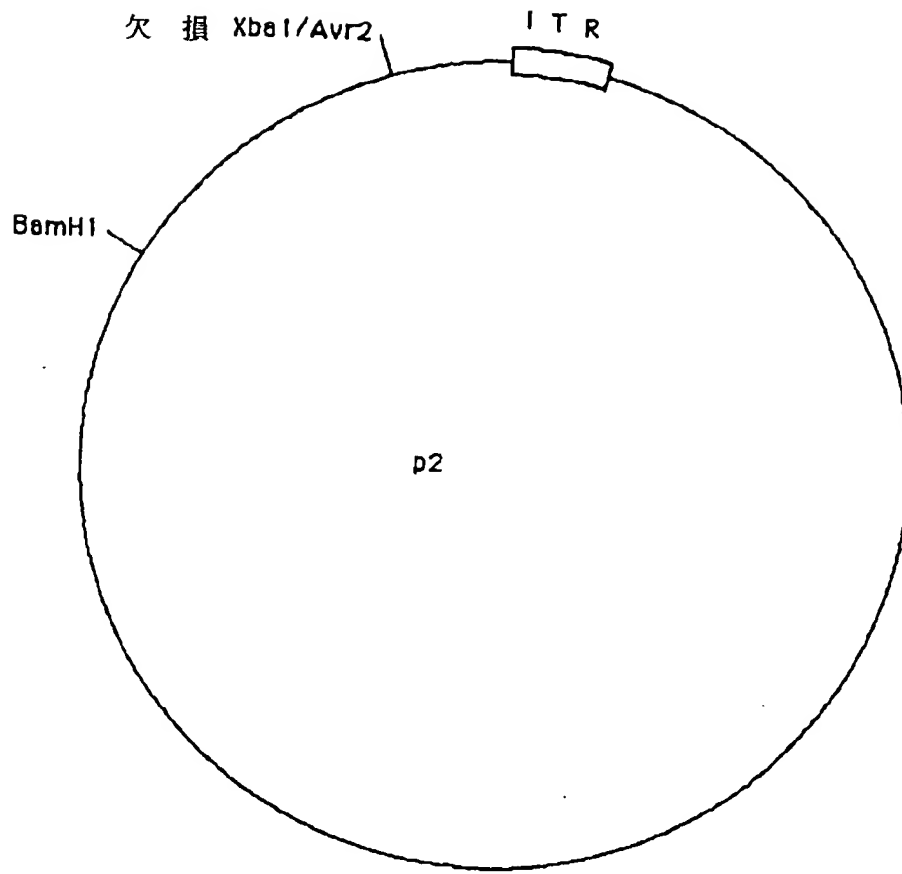


Figure 8

【図9】

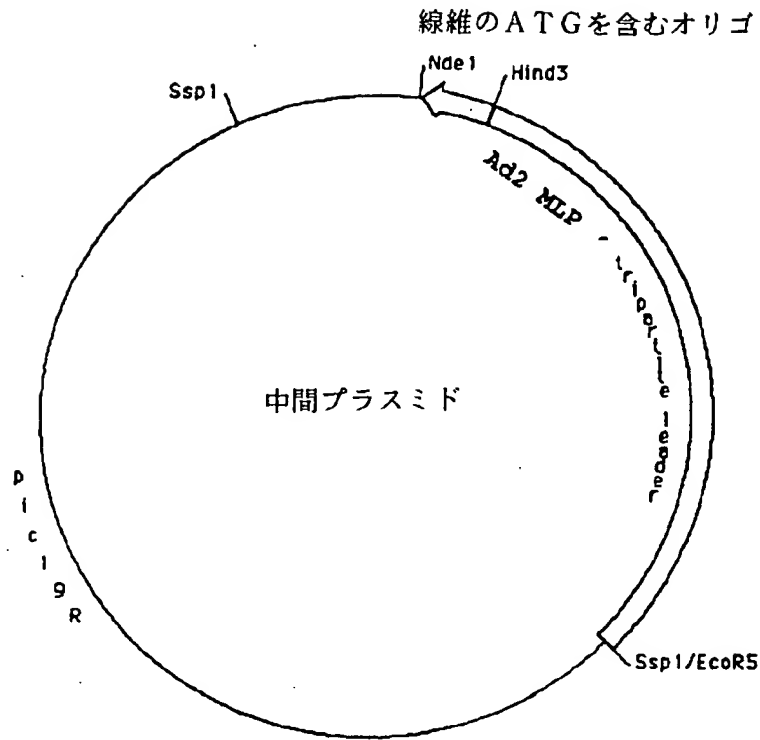


Figure 9

【図10】

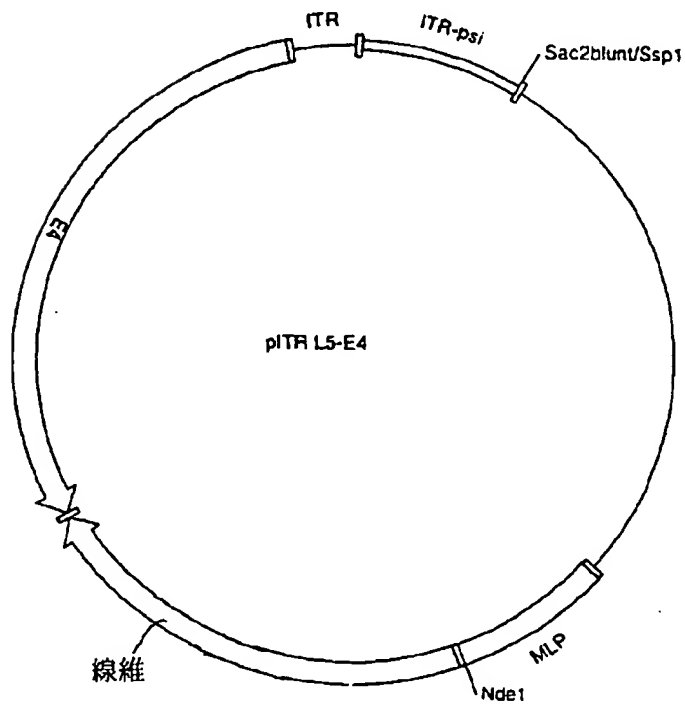


Figure 10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No. PCT/FR 94/00851	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/86 C12N15/34 C12N5/10 C12N7/04 C07K14/075	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K A61K	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages
P, X	WO, A, 94 12649 (GENZYME CORP.) 9 June 1994
	see the whole document ---
A	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 63, no. 6, June 1989 pages 2709 - 2717 BABISS, L.E. 'The cellular transcription factor E2f requires viral E1A and E4 gene products for increased DNA-binding activity and functions to stimulate adenovirus E2A gene expression' see page 2715, column 2, line 53 - line 62 --- -/--
	1-3, 5, 7, 9, 19, 28-30 1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 5 September 1994	Date of mailing of the international search report 21-09-1994
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentkan 1 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2060, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No

PCT/FR 94/00851

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUMAN GENE TRANSFER vol. 219 , 1991 pages 51 - 61 STATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' see page 58, paragraph 6 ---	1
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 80 , September 1983 , WASHINGTON US pages 5383 - 5386 WEINBERG, D.H. & KETNER, G. 'A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of human adenovirus type 2' see the whole document ---	21
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 17, no. 8 , 1989 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 3037 - 3047 KETNER, G. ET AL. 'Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids' ---	21
A	WO,A,93 06223 (CNRS) 1 April 1993 see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

 International Application No.
 PCT/FR 94/00851

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9412649	09-06-94	AU-B- 5734994	22-06-94
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A- 2681786	02-04-93
		AU-A- 2790292	27-04-93
		EP-A- 0559884	15-09-93
		JP-T- 6502771	31-03-94

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 48/00		8314-4 C	
C 1 2 N 5/10			
7/04		8931-4 B	
15/09			

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, L K, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, UZ, VN

(72)発明者 イー, パトリス
フランス国エフー75005パリ・リュラセペ
ド11ビス